

**Der Einfluß von cytostatischen Substanzen
auf die Blastzelltransformation von Lymphknoten-
und Milzzellen**

von

Dietmar Leykam

aus

Ahorn-Coburg

Aus der Abteilung für klinische Immunologie
des Universitätskrankenhauses Erlangen-Nürnberg
Vorstand: Professor Dr. med. F. Scheiffarth

Der Einfluß von cytostatischen Substanzen auf die Blastzelltransformation von Lymphknoten- und Milzzellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt
von
Dietmar Leykam
aus
Ahorn-Coburg

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Referent: Prof. Dr. med. F. Scheiffarth

Dekan: Prof. Dr. med. G. Koch

Tag der mündlichen Prüfung: 21. März 1972

Meinen Eltern gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

Beeinflußung der Lymphozytentransformation durch Zytostatika	Seite 1
Material und Methoden	7
Ergebnisse	10
Diskussion	18
Zusammenfassung	22
Literaturverzeichnis	23



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548617_0075

Beeinflussung der Lymphozytentransformation durch Zytostatika

Die Wirkung von Zytostatika ist zum größten Teil aufgeklärt. Sie greifen in den Stoffwechsel mit dem Endeffekt ein, daß eine Zellteilung unterbleibt. Ein Gesichtspunkt ihrer Einteilung ist die unterschiedliche Wirkungsweise dieser Substanzen. In der Klinik haben heute 5 Gruppen Eingang gefunden, die Alkylantien, die Antimetaboliten, die Mitosehemmstoffe, energiereiche Strahlung und indirekt wirkende Hormone.

Die Alkylantien, zu ihnen gehören einige Antibiotika, Cyclophosphamid, Busulfan, Chlorambucil u.a., sind Substanzen, welche nach Aufnahme in die Zelle mit Strukturen Verbindungen eingehen, wobei insbesondere die DNS des Kernes reagiert. Zwei Wirkungsprinzipien sind zu diskutieren, einmal die Vernetzung der Moleküle, wodurch es zur funktionellen Beeinträchtigung des DNS-Stranges mit allen ihren Konsequenzen kommt. Als Reaktionsort ist das gesamte Molekül geeignet. Das zweite Prinzip stellt die einfache Alkylierung, damit die Quaternisierung eines Stickstoffmoleküls dar. Die 7-Position des Guanins scheint besonders empfindlich zu sein, so daß es gerade an dieser Stelle durch die Lockerung der Guanin-Ribose-Bindung zum Auseinanderbrechen des Moleküls kommt. In gewisser Weise gleicht dieser Vorgang der Wirkung energiereicher Strahlung, z.B. Röntgenstrahlung, so daß von einem chemischen Röntgeneffekt

gesprochen werden kann. Die Veränderungen sind demnach Punktmutationen gleichzusetzen. Makroskopischer Ausdruck einer solchen Wirkung sind u.a. Chromosomenbrüche.

Eine andere, heute bevorzugt eingesetzte Stoffgruppe sind die Antimetaboliten, zu ihnen gehören Purin-, Pyrimidin- und Folsäureantagonisten. Sie greifen ebenfalls in den Stoffwechsel ein; doch geschieht dies in einem konkurrierenden Effekt, indem physiologische Intermediärprodukte durch ähnliche Substanzen verdrängt werden. Die ausgetauschten Substanzen können im weiteren Stoffwechsel nicht mehr die Vertreterrolle übernehmen, wobei die Kette aller Reaktionen gestoppt wird. Da dies im Baustoffwechsel mit purin-, pyrimidin- und folsäureanalogen Substanzen möglich ist, kann eine weitere Einteilung in Purin-, Pyrimidin- und Folsäureantagonisten vorgenommen werden. Purin- oder Pyrimidinantagonisten werden in das DNS-, bzw. RNS-Molekül eingebaut, ohne ihre Aufgabe durch Weitergabe des genetischen Codes erfüllen zu können. Folsäureantagonisten wirken über die Besetzung der Folsäurereduktase, so daß die Bildung der wirksamen Tetrahydrofolsäure unterbrochen wird und die Transferierung von C_1 -Bruchstücken unterbunden wird.

Alkylantien und Antimetaboliten haben somit eine prinzipiell unterschiedliche Wirkungsweise. Dies kommt bei Untersuchungen im Rahmen der Beeinflussung der Immunantwort in vielfältiger Weise zum Ausdruck.

Die Immunantwort ist stets eine zelluläre Reaktion auf ein Antigen. Sie kann sich in vier unterschiedlichen Reaktions-

weisen mitteilen: 1. Die Antikörperproduktion, 2. die Entwicklung der spezifischen zellvermittelten Immunität, 3. das Phänomen der Sekundärantwort und 4. unter besonderen Bedingungen das Ausbleiben einer spezifischen Immunantwort, die Immuntoleranz oder Immunparalyse.

Vom Erkennen des Antigens bis zum Auftreten spezifischer Reaktionspartner ist eine Reihe von zellulären Leistungen erforderlich. Dies gilt für zell- und antikörpervermittelte Immunphänomene in gleicher Weise, wobei letztere in gewissem Maße als in die Umgebung von Immunzellen verlegte Reaktionen betrachtet werden können. Die nach Antigenkontakt einsetzende Immunantwort ist nur durch rasch aufeinanderfolgende Zellteilungen möglich. Dies geschieht nach Art einer Kettenreaktion, wodurch der Zuwachs immer größer wird. Erst nach einer Reihe von Zellteilungen läßt das exponentiale Anwachsen der beteiligten Zellzahl durch Ruhepausen einzelner Zellen nach. Die Zellteilungen sind nur durch einen zwischen den Teilungen aktiven Syntheseprozess von Zellsubstanz möglich. Er ist der Angriffspunkt der zytostatischen Substanzen.

Die unterschiedliche Wirkungsweise der beiden Stoffgruppen macht sich hinsichtlich ihrer immunsuppressiven Eigenschaften bemerkbar. Da die Alkylantien auch eine ruhende Zelle treffen können und vorgefertigte Substanzen verändern, sind sie während ihrer vollen Sensibilisierungsphase wirksam, d. h. sie entfalten einen immunsuppressiven Effekt in einem Zeitraum, der von einem Tag vor bis zu mehreren Tagen nach der Sensibilisierung reicht. Dagegen ist die Wirkung der Anti-

metaboliten auf die vorwiegend stoffwechselaktiven Phasen beschränkt, woraus sich eine Einschränkung der Wirkungs-
dauer auf ein bis zwei Tage nach der Sensibilisierung ergibt.

Die immunsuppressive Wirkung ist allgemein gültig; sie ist bei allen Formen der Immunantwort demonstrierbar. Am deutlichsten ist sie bei der Primärantwort, die unter einer besonders hohen Zellteilungsrate abläuft, da die immunologisch kompetente Zelle nach ihrem Kontakt mit dem Antigen die Fähigkeit erhält, sich zu vermehren und außerdem mit dem Antigen zusammenzuwirken. Diese Population unterscheidet sich von der immunkompetenten Ausgangszelle und fungiert als Gedächtniszelle, die nach einem erneuten Kontakt mit dem Antigen sich zur antikörperproduzierenden Zelle weiterdifferenziert. Da die Sekundärantwort auf Zellen zurückgeht, die nach Antigenkontakt auf einen zweiten, vom selben Antigen ausgehenden Reiz vorbereitet sind und sich in einer relativen Ruhepause befinden, ist hier die Zellteilung weniger wichtig als bei der Primärantwort und somit auch die Wirkung der immunsuppressiven Maßnahmen weniger effizient. Dies gilt generell für alle Arten der Immunsuppression, dh. auch für physikalische (z.B. Röntgenstrahlen) oder biologische (z.B. Antilymphozytenglobulin) Maßnahmen. Allerdings ist hier wiederum die Wirkungsweise für den Effekt entscheidend: Alkylantien zeitigen einen größeren Einfluß als Antimetaboliten.

Eine Immunsuppression mit chemischen Mitteln kann bei zellu-

lär wie bei humoral vermittelten Phänomenen nachgewiesen werden. Insofern eignen sich zur Prüfung der Wirksamkeit die Überlebenszeit von Transplantaten ebenso wie die Bestimmung von Antikörpertitern nach Sensibilisierung. Die Untersuchungen können in vitro oder in vivo durchgeführt werden, wobei zu bemerken ist, daß manche Substanzen erst enzymatisch aktiviert werden müssen, ehe sie ihre Wirksamkeit entfalten. Daher sind sie nur in vivo zu testen.

Wie bei fast allen chemischen Substanzen läßt sich auch bei immunsuppressiven eine Dosiseffektkurve ermitteln, aus welcher der bei verschiedenen angebotenen Mengen resultierende Effekt abgeleitet werden kann. Dies einfache Schema einer linearen Korrelation gilt in einem engen Bereich. Niedrige Dosen können ohne erkennbare Wirkung sein oder bei geeignetem Applikationsschema sogar eine Steigerung der Immunantwort bewirken (6,7,21). Hierfür bietet sich als Erklärung die Freisetzung stimulierender Faktoren aus betroffenen Zellen an. Eine maximale Dosis wiederum ist zur Prüfung der immunsuppressiven Wirksamkeit nicht geeignet, da es zum exitus letalis kommt, weil die Substanzen aufgrund ihrer Wirkungsprinzipes nicht selektiv immunkompetente Elemente schädigen, sondern generell jede Zelle angreifen, hier insbesondere die teilungsaktiven (z.B. Knochenmark, Epithelien, Gonaden). Dies macht zugleich deutlich, daß Immunsuppression nicht spezifisch ist, also durch die Wahl des Antigens nicht

beeinflusst wird. Bemerkenswert bei der Dosiseffektrelation ist die Möglichkeit, Toleranz zu induzieren. Dies gelingt, wenn man zugleich zu einem Antigen in geeignetem Schema eine immunsuppressive Substanz verabreicht. Damit kann erreicht werden, daß bei weiterem Kontakt mit demselben Antigen eine Immunantwort unterbleibt. Die erreichte Toleranz ist spezifisch, d. h. nur für dieses eine Antigen gültig, während andere Antigene eine spezifische Immunreaktion auslösen. Die Induzierung der Toleranz hingegen ist unspezifisch, weil mit verschiedenen Antigenen möglich, wobei allerdings wichtig ist, daß gegen stärker antigenwirksame Substanzen eine Toleranz schwieriger oder garnicht induziert werden kann.

Die bislang über medikamentöse Immunsuppression bekannten Tatsachen rechtfertigen es, die In-vivo-Suppression der Lymphozytentransformation (3,5,8,14,15) durch Alkylantien und Antimetaboliten in der Abhängigkeit von der Dosis zu überprüfen. Sie wurde gewählt, weil hier durch den Einbau von isotopenmarkierten Purinen die DNS-Syntheserate, die als Maß für die Immunantwort gewertet werden kann, eine exakte Messung möglich macht.

Methodik

Tiermaterial

Für die Versuche wurden weibliche MNRI-Mäuse mit einem Gewicht von 25 g verwendet. Das Alter betrug wenigstens drei Monate.

Behandlung

6-Mercaptopurin (6-MP) wurde so aufgeschwemmt, daß die jeweilige Einzeldosis in 0,5 ml Hanks-Lösung enthalten war. Von Cyclophosphamid (Cph) wurde die Lösung zur i.v.-Injektion verwendet. Die Verdünnung wurde ebenfalls so gewählt, daß 0,5 ml injiziert wurden. Die Injektion erfolgte intraperitoneal. Die Dosierung betrug bei der einmaligen Gabe 2, 10, 50, 250 und 1000 mg/kg. Bei wiederholter Injektion wurde eine Dosis von 10 mg/kg siebenmal im Abstand von 48 Stunden appliziert.

Technik der Lymphozytenkulturen

48 Stunden nach der einmaligen bzw. letzten Injektion wurden die Tiere durch cervikale Dislokation getötet und die inguinalen, axillären und cervikalen Lymphknoten, sowie die Milz steril entnommen. Durch Zerzupfen der Organe wurden die Zellen gewonnen und in Kulturmedium suspendiert. Das Kulturmedium bestand aus EAGLES MEM unter Zusatz von 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum mit 1 mM Glutamin und 1 mM Arginin. Außerdem wurden pro 100 ml 0,01 g Streptomycin und 2.000 I.E. Penicillin zugefügt.

Die Prozentzahl der lebenden Zellen wurde mit Hilfe des Farbstoffexclusionstestes unter Verwendung von 0,5%iger Trypanblaulösung bestimmt. Sie betrug immer über 90%.

5×10^6 Zellen wurden in 3 ml frischem Kulturmedium in einer Atmosphäre aus 5% CO_2 und 95% Luft bei 37°C in Glasröhrchen gezüchtet.

Die Milzzell- und Lymphknotenzellkulturen wurden je vierfach angesetzt, wobei je zwei Kulturen jeweils 0,005 ml Phytohämagglutinin P (PHA, Burroughs, Wellcome and Co.) zugegeben wurden. Die Bebrütung erfolgte drei Tage lang. 24 Stunden vor Entnahme der Zellen wurden $5 \mu\text{C}$ ^3H -Thymidin zugefügt.

Die Auswertung der Lymphozytentransformation erfolgte durch Messung des ^3H -Thymidineinbaues in die Zellen mit Hilfe des Flüssigkeitsszintillationszählers.

Bestimmung der Transformationsrate

Den Kulturen wurde 1 ml eiskalte physiologische NaCl-Lösung zugegeben. Das Sediment wurde dreimal mit 5 ml physiologischer NaCl-Lösung bei 1000 rpm gewaschen. Anschließend wurde dem Sediment ein Tropfen Mischserum und 2,5 ml 5%iger Trichloressigsäure zugefügt. Der Ansatz blieb 30 Minuten bei Zimmertemperatur stehen. Nach dem Abzentrifugieren erfolgte noch ein Waschgang mit 5 ml 5%iger Trichloressigsäure. Das Sediment wurde in 0,5 ml Digestin (Merck) aufgelöst und 0,1 ml dieser Lösung 10 ml einer Szintillationsflüssigkeit zugesetzt, die

aus einem Teil Methanol, drei Teilen Toluol und 4 g PPO und 1 g Dimethyl-POPOP pro Liter bestand. Die gespeicherte Radioaktivität wurde in einem Flüssigkeitsszintillations-spektrometer (Packard M2) gezählt.

Die cpm der durch PHA stimulierten Zellen wurden in Beziehung gesetzt zu den cpm der nicht stimulierten Zellen:

$$Q = \frac{\text{cpm}_{\text{stim.PHA}}}{\text{cpm}_{\text{unstim.}}}$$

Das Ausmaß der Suppression der Transformation durch die verwendeten Substanzen ließ sich durch den Index Q von behandelten und unbehandelten Mäusen vergleichen. Die Indices für Lymphknoten- und Milzzellen wurden getrennt errechnet. Die Ergebnisse wurden durch die Varianzanalyse auf Signifikanz geprüft. x)

x) Für die Ausführung der Rechenarbeiten danke ich Herrn
Dipl.Phys. R. Neuwirth, Med. Univ. Klinik

Ergebnisse

Die einmalige Dosis von 1000 mg/kg Cph verursachte innerhalb von 24 Stunden den Tod aller Testtiere, während die einmalige Dosis von 1000 mg/kg 6-MP nicht zum Tod, wohl aber zu einem moribunden Allgemeinzustand innerhalb der Beobachtungszeit von 48 Stunden führte.

Die niedrigeren Dosen (2, 10, 50, 250 mg/kg) als einmalige Gaben ebenso wie die siebenmalige Applikation von 10 mg/kg verursachten keine sichtbaren Beeinträchtigungen innerhalb der Beobachtungszeit von maximal 14 Tagen.

Der Effekt von Cph auf die Transformation von Milzzellen

Die Ergebnisse sind in den Tabellen 1 und 2 und in Abb. 1 zusammengefaßt. Im Vergleich zu den unbehandelten Tieren (Tab. 4) wurde eine signifikante Unterdrückung der Transformationsrate der durch PHA stimulierten Zellen nur bei der einmaligen Dosis von 50 und 250 mg/kg gesehen (Tab. 5). Die einmaligen Dosen von 2 und 10 mg/kg bewirkten keine signifikante Hemmung. Im Gegenteil die einmalige Dosis von 10 mg/kg bewirkte eine leichte Stimulation der Transformation.

Der Effekt von Cph auf die Transformation von Lymphknotenzellen

Die Ergebnisse sind in den Tabellen 1 und 2 und in Abb. 1 zusammengefaßt. Nur die einmalige Dosis von 250 mg/kg unterdrückte signifikant die durch PHA stimulierte Transformation im Vergleich zu unbehandelten Tieren (Tab. 6).

Die einmaligen Dosen von 2, 10 oder 50 mg/kg zeigten keine signifikante Hemmung der Transformation.

Tab. 1: Mittelwerte der Quotienten aus $\frac{\text{cpm}_{\text{stim.PHA}}}{\text{cpm}_{\text{unstim.}}}$ aus Lymphozytenkulturen von jeweils 6 Mäusen, die mit unterschiedlichen Dosen Cph einmalig vorbehandelt wurden.

Dosis mg/kg	Lymphknotenzellen	Milzzellen
2	189,8 $\pm$ 135,0	19,0 $\pm$ 4,8
10	217,9 $\pm$ 169,9	43,5 $\pm$ 10,6
50	75,8 $\pm$ 24,3	5,9 $\pm$ 2,9
250	56,7 $\pm$ 27,3	11,6 $\pm$ 8,8

Tab. 2: Mittelwerte der Quotienten aus $\frac{\text{cpm}_{\text{stim.PHA}}}{\text{cpm}_{\text{unstim.}}}$ aus Lymphozytenkulturen von jeweils 6 Mäusen, die mit 7 x 10 mg/kg Cph oder 6-MP vorbehandelt wurden.

Medikament	Lymphknotenzellen	Milzzellen
Cph	302,8 $\pm$ 241,2	32,7 $\pm$ 20,2
6-MP	317,9 $\pm$ 204,3	21,7 $\pm$ 11,3

Der Effekt von 6-MP auf die Transformation von Milzzellen

Die Ergebnisse sind in den Tabellen 2 und 3 und in Abb. 2 zusammengefaßt. Verglichen mit unbehandelten Tieren ergab die einmalige Dosis von 2, 10, 50, 250 oder 1000 mg/kg keinen signifikanten Einfluß auf die Transformationsrate (Tab. 7), ebenso die siebenmalige Applikation von 10 mg/kg.

Der Effekt von 6-MP auf die Transformation von Lymphknoten- zellen

Die Ergebnisse sind in den Tabellen 2 und 3 und in Abb. 2 zusammengefaßt. Im Vergleich zu den unbehandelten Tieren wurde nach der einmaligen Dosis von 1000 mg/kg die durch PHA stimulierte Transformation signifikant gehemmt (Tab. 8). Niedrigere Dosen (2, 10, 50, 250 mg/kg) oder wiederholte Dosen (7 x 10 mg/kg) hatten keinen Einfluß auf die Transformationsrate. Im Gegenteil, die einmaligen Dosen von 2 und 10 mg/kg bewirkten eine leichte Stimulation der Transformation.

Tab. 3: Mittelwerte der Quotienten aus $\frac{\text{cpm}_{\text{stim.PHA}}}{\text{cpm}_{\text{unstim.}}}$
aus Lymphozytenkulturen von jeweils 6 Mäusen,
die mit unterschiedlichen Dosen 6-MP einmalig
vorbehandelt wurden.

Dosis mg/kg	Lymphknotenzellen	Milzzellen
2	66,9 ± 40,0	10,8 ± 5,5
10	99,2 ± 45,6	7,7 ± 4,9
50	99,5 ± 78,8	12,1 ± 14,8
250	77,9 ± 52,8	9,1 ± 6,2
1000	5,8 ± 3,9	9,8 ± 9,1

Tab. 4: Mittelwerte der Quotienten aus $\frac{\text{cpm}_{\text{stim.PHA}}}{\text{cpm}_{\text{unstim.}}}$
aus Lymphozytenkulturen von 12 unbehandelten
Mäusen.

Lymphknotenzellen	Milzzellen
191,8 ± 183,8	32,2 ± 18,7

Tab. 5: Varianzanalyse der Ergebnisse der Milzzellenkulturen von mit verschiedenen Einzeldosen Cph vorbehandelten und unbehandelten Tieren.

$0,05 > p > 0,01$ (x)

$0,01 > p > 0,005$ (y)

$p < 0,005$ (z)

Dosis mg/kg	unbeh.	2	250	50
10	0,2245	0,3586 (x)	0,6717 (z)	0,9045 (z)
unbeh.		0,1341	0,4472 (y)	0,6800 (z)
2			0,3131	0,5459 (z)
250				0,2328

Tab. 6: Varianzanalyse der Ergebnisse der Lymphknoten-zellkulturen von mit verschiedenen Einzeldosen Cph vorbehandelten und unbehandelten Tieren.

$0,05 > p > 0,01$ (x)

Dosis mg/kg	2	unbeh.	50	250
10	0,0403	0,1299	0,3909 (x)	0,5203 (x)
2		0,0896	0,3506	0,4800 (x)
unbeh.			0,2610	0,3904 (x)
50				0,1294

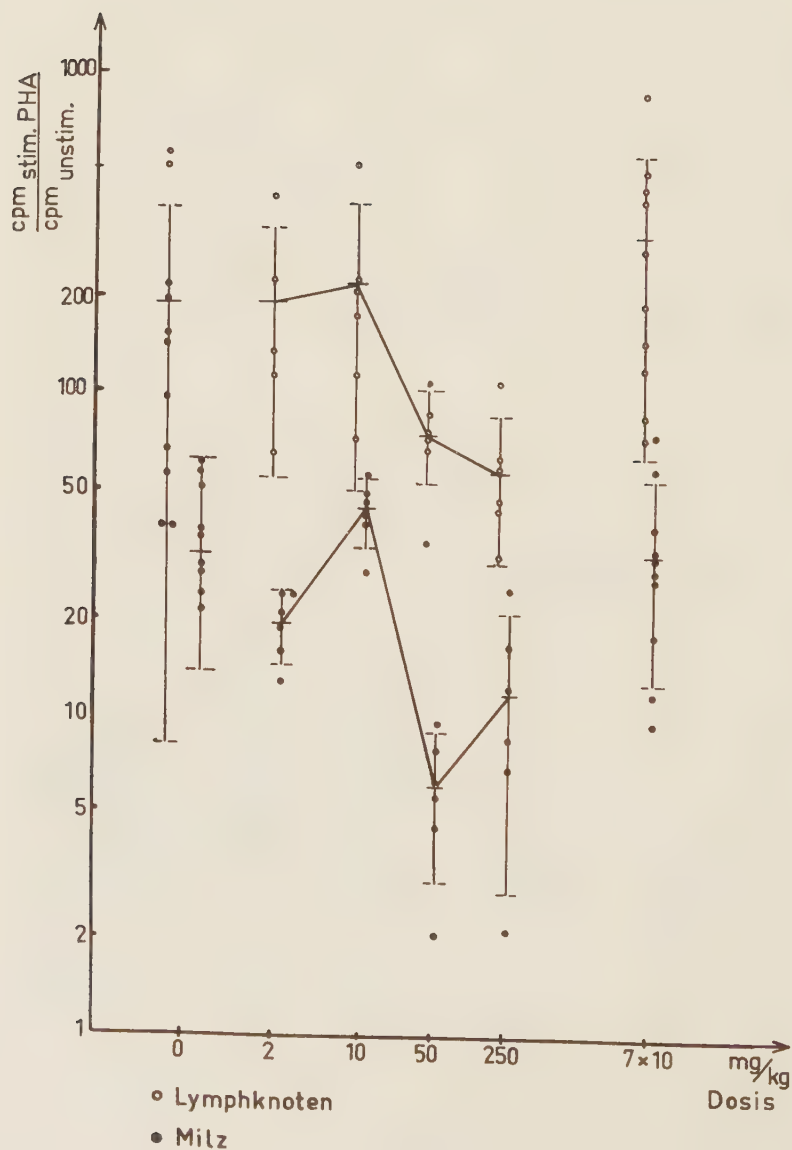
Tab. 7: Varianzanalyse der Ergebnisse der Milzzellenkulturen von mit verschiedenen Einzeldosen 6-MP vorbehandelten und unbehandelten Tieren.

Dosis mg/kg	2	250	1000	10	50
unbeh.	0,0631	0,1407	0,1714	0,2633	0,3467
2		0,0776	0,1083	0,2002	0,2836
250			0,0307	0,1226	0,2060
1000				0,0919	0,1753
10					0,0834

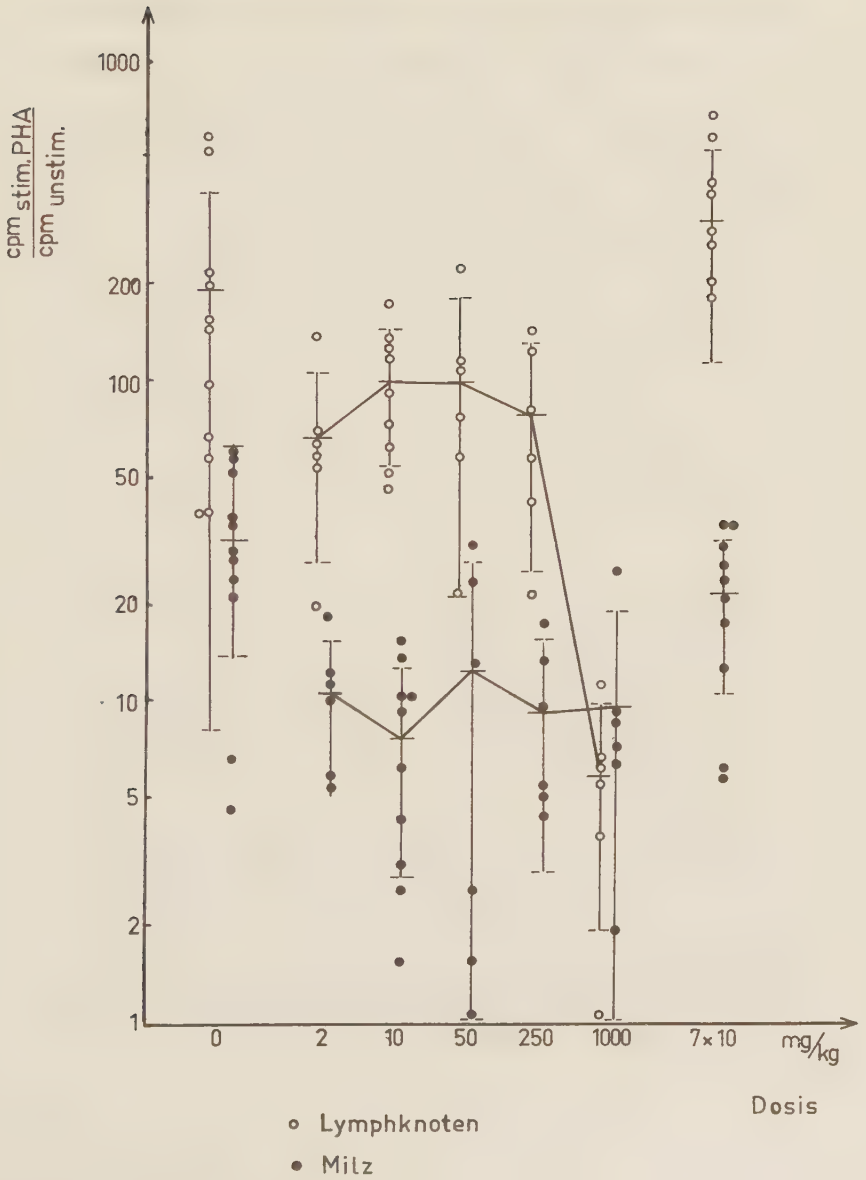
Tab. 8: Varianzanalyse der Ergebnisse der Lymphknoten-zellkulturen von mit verschiedenen Einzeldosen 6-MP vorbehandelten und unbehandelten Tieren.

p < 0,005 (z)					
Dosis mg/kg	10	50	250	2	1000
unbeh.	0,1639	0,2213	0,3028	0,3548	1,4570 (z)
10		0,0574	0,1389	0,1909	1,2931 (z)
50			0,0815	0,1335	1,2357 (z)
250				0,0520	1,1542 (z)
2					1,1022 (z)

Beeinflussung der DNA-Synthese in Lymphozytenkulturen nach in vivo Behandlung mit Cyclophosphamid



Beeinflussung der DNA-Synthese in Lymphozytenkulturen
nach in vivo Behandlung mit 6-Mercaptopurin



Diskussion

Der Einfluß der Zytostatika auf die durch PHA stimulierte Transformation ist offensichtlich.

Die Hemmung der Transformationsrate der Milzzellenkulturen der mit Cph behandelten Mäuse ist gut erkennbar. Signifikante Unterschiede ergaben die Gruppen mit den einmaligen Dosen von 50 mg/kg Cph ($p < 0,005$) und 250 mg/kg Cph ($0,01 > p > 0,005$). Niedrigere Dosen wirkten sich nicht hemmend aus. Im Gegenteil, die einmalige Applikation von 10 mg/kg bewirkte eine leichte, aber nicht signifikante Steigerung des ^3H -Thymidin-Einbaus in die gezüchteten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Tieren.

6-MP hatte annähernd die gleiche Wirksamkeit auf die Transformation der Lymphknotenzellen. Eine signifikante Hemmung der Transformationsrate konnte nur nach der einmaligen Gabe der Maximaldosis von 1000 mg/kg gefunden werden ($p < 0,005$). Wiederum im Gegensatz dazu bewirkten einmalige Dosen von 10 oder 50 mg/kg ein leichtes Ansteigen der Transformationsrate.

Die Unterschiede in den Transformationsraten der Lymphknotenzellen von mit Cph behandelten Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren waren kleiner. Eine Inhibition der Transformation konnte nur bei Tieren gezeigt werden, die eine Dosis von 250 mg/kg erhalten hatten

($0,01 > p > 0,005$). Die Applikation von 10 mg/kg verursachte eine leichte Senkung der Transformationsrate.

Die Behandlung mit 6-MP zeigte keinen signifikanten Effekt auf die Transformationsrate von Milzzellen.

Wenn man beide Medikamente vergleicht, ist die größere Wirksamkeit von Cph bei den angewendeten Versuchsansätzen hervorstechend. Cph bewirkte eine deutliche Unterdrückung der Transformation bei Lymphknoten- und Milzzellen.

Die Wirksamkeit von Cph wird auch durch dessen Toxizität demonstriert, die durch den Tod der behandelten Tiere gezeigt wird.

Im Gegensatz zu Cph unterdrückte 6-MP lediglich die Transformation von Lymphknotenzellen; die Milzzellentransformation wurde durch 6-MP anscheinend nicht beeinflusst.

Die unterschiedliche Wirksamkeit der untersuchten Medikamente ist auf die Wirkungsweise von alkylierenden Substanzen und Antimetaboliten zurückzuführen, die sich grundsätzlich unterscheidet. Cph wirkt auch auf die Proteinsynthese von unstimulierten Zellen ein. 6-MP dagegen reagiert kompetitiv mit Purin und ist deshalb nur bei einem aktiven Kernstoffwechsel wirksam, d. h. nur bei wachsenden und sich teilenden Zellen.

Der Einwand, daß die Dosen der in den Experimenten untersuchten Medikamente nicht vergleichbar sind, kann mit

dem Hinweis auf das weite Dosierungsspektrum zurückgewiesen werden.

Es hat sich ergeben, daß die Transformation von Lymphknotenzellen durch Zytostatika stärker beeinflußt wird als die von Milzzellen, wobei 6-MP signifikanter ist als Cph. Diese Ergebnisse können auf die unterschiedliche Zusammensetzung von Lymphknoten- und Milzzellenpopulationen zurückgeführt werden. Lymphknotenzellen sind eine verhältnismäßig homogene Population von thymusstämmigen Lymphozyten. Im Gegensatz dazu stellen Milzzellen eine gemischte Population aus Makrophagen, Monozyten und Lymphozyten, die aus dem Knochenmark oder dem Thymus stammen dar.

Die Senkung der Transformationsrate durch hohe Dosen von Zytostatika ist ohne Schwierigkeit zu erkennen. Jedoch ist die leichte Stimulation der Transformation bei Tieren, die mit niedrigen Einzeldosen behandelt wurden, nicht zu vernachlässigen. Sie stimmt mit der Beobachtung überein, daß nach dem Beginn einer zytostatischen Behandlung oft eine vorübergehende Steigerung der Aktivität des immunologischen Systems zu verzeichnen ist (6,7,21). Dieser Initialphase folgt die der Aktivitätsminderung.

Wiederholte kleine Dosen haben keinen Einfluß auf die Transformationsrate. Dieses Ergebnis mußte angesichts der Tatsache erwartet werden, daß die applizierte Ge-

samtdosis niedriger war als diejenige Einzeldosis, die gerade noch ausreichend war, um die Transformationsrate zu senken.

Die Lymphozytentransformation ist nur ein Indikator für die Aktivität des Immunsystems. Andere Kriterien sind u.a. die zelluläre Antikörperbildung und die Transplantatabstoßung. Es wurde beschrieben, daß jede der erwähnten zellulären Funktionen durch Zytostatika unterdrückt werden kann (1,2,4,9,12,13,16-20,22-26,10).

Die Lymphozytentransformation ist auf ihre Weise ein Gradmesser für die Aktivität des Immunsystems. Die Ergebnisse der vorliegenden Experimente zeigen, daß Zytostatika nur hemmend auf das Immunsystem einwirken, wenn diese in hohen Dosen appliziert werden. Wie bei der Behandlung von Immunerkrankungen des Menschen kann aus diesen Untersuchungen geschlossen werden, daß eine wirkliche Immunsuppression nur mit toxischen Dosen erreicht werden kann (4).

Jedoch muß berücksichtigt werden, daß bei den vorliegenden Experimenten PHA als Stimulans auf alle kultivierten Zellen einwirkt, während bei Autoaggressionskrankheiten des Menschen nur ein Clon der immunkompetenten Zellen aktiviert ist und es könnte sein, daß unter diesen Bedingungen der entsprechende Clon gehemmt wird.

Zusammenfassung

14 Gruppen, bestehend aus jeweils 6 Mäusen des Inzuchtstammes NMRI, wurden in einmaliger Dosierung 2, 10, 50, 250 oder 1000 mg/kg Cyclophosphamid bzw. 6-Mercaptopurin appliziert oder siebenmal jeweils 10 mg/kg dieser Substanzen verabreicht. 48 Stunden nach der Applikation wurden Lymphknoten und Milz den Tieren entnommen und die Zellen dieser Organe isoliert. Sie wurden in Kulturen gehalten und mit Phythämagglutinin stimuliert. Die Transformationsrate wurde aus dem Einbau von Tritium-markiertem Thymidin im Vergleich zu Kulturen unbehandelter Tiere errechnet.

Die Resultate zeigen eine Hemmung der Transformationsrate nur nach maximaler Stimulation, wobei sich Cyclophosphamid dem 6-Mercaptopurin als überlegen erweist. Lymphknotenzellen sind sensitiver als Milzzellen.

Die Ergebnisse beweisen, daß durch in vivo Applikation von cytostatisch wirkenden Substanzen eine in vitro Hemmung von immunkompetenten Zellen erzielt werden kann. Die unterschiedlichen Resultate sind auf den jeweiligen Wirkungsmechanismus der geprüften Substanzen und auf die verschiedene Zusammensetzung der untersuchten Zellpopulationen zurückzuführen.

Literaturverzeichnis

1. AMIRA MANY, SCHWARTZ, R.S.
On the mechanism of immunological tolerance in cyclo-
phosphamid-treated mice
Clin. exp. Immunol., 6/87, 1970
2. ARGANO S.A.P., TOBIN M.S.
Temporary inhibition of antibody production by
6-mercaptopurine
Res. (N.Y.), 5/4, 1968
3. ASTALDI, G.
Das Phythämagglutinin und das Problem der Lymphozyten
Med. Klinik 59/368, 1964
4. ASTALDI, G., ERIDANI, S., PONTI, G.B. et al.
Influence of antiblastic agents applied either in vivo
or in vitro on human lymphocyte transformation in cell
culture
Blut 19/1, 1969
5. BACH, F., HIRSCHHORN, K.
Lymphocyte interaction: a potential histocompatibility
test in vitro
Science 143/813, 1964
6. CHANMOUGAN, D., SCHWARTZ, R.S.
Enhancement of antibody synthesis by 6-mercaptopurine
J. exp. Med. 124/363, 1966
7. DIXON, F.J., McCOHANEY, P.J.
Enhancement of antibody formation by whole body
X-irradiation
J. exp. Med. 117/833, 1963

8. ELVES, M.W.
The Lymphocytes
Lloyd-Luke Ltd, London 1966
9. FOX, M.
Suppression of tissue immunity by cyclophosphamid
Transplantation 2/475, 1964
10. HOPPE, I., MASAOKA, T., JAHN, E.
Faktoren und Einfluß auf den immunsuppressiven Endoxan-
effekt. I. Das Verhalten der immun. Stammzellen
Verhandl.Dtsch.Ges.Inn.Med. 74, 1968
11. HURD, E.R., ZIFF, M.
Studies on the anti-inflammatory action of 6-MP
J.Exp.Med. 128/4, 1968
12. JONES, J.W., BRODY, G.L., ONEAL, R.M., HAIMS, R.F.
Prolongation of skin homografts in rabbits using
cyclophosphamid
J.Surg.Res. 3/189, 1963
13. LERMAN, S.P., WEIDANZ, W.P.
The effect of cyclophosphamid on the ontogeny of the
humoral immune response in chickens
Journ.of Imm., 105/3, 1970
14. LING, N. R.
Lymphocyte stimulation
North-Holland, Amsterdam 1968
15. MANGI, R.J., MARCLINEY jr., M.R.
Transformation of mouse lymphocytes to allogenic
lymphocytes and phytohemagglutinin
Journ. of Imm., 105/1, 1970

16. MEEKER, W.R., CONDIE, R.M., GOOD, R.A., VARCO, R.L.
Alteration of the homograft response by antimetabolites
Ann.N.Y. Acad. Sci., 87/203, 1960
17. MEEKER, W., CONDIE, R., WEINER, D., VARCO, R.L., GOOD, R.A.
Prolongation of skin homograft survival in rabbits
by 6-mercaptopurine
Proc. Exp. Biol. Med., 102/459, 1959
18. MILLER III, J.J., COLE, L. J.
Resistance of long-lived lymphocytes and plasmacells in
rat lymphnodes to treatment with prednisone, cyclo-
phosphamid, 6-mercaptopurine and actinomycin D
Exp. Med. 126/1, 1967
19. ROSE, N.R., HABER, J. A., CALABRESI, P.
Immunosuppressive effects of selected inhibitors in
vivo and in vitro
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (N.Y.) 128/4, 1968
20. SANTOS, G.W., OWENS, A.H.
A comparison of the effects of selected cytotoxic
agents on allogenic skin graft survival in rats
Bull. Hopkins Hosp. 116/327, 1965
21. SCHEIFFARTH, F., BAENKLER, H.W., FLIERL, W.
Durch Immunsuppressiva gesteigerte zelluläre Anti-
körpersynthese
All.u.Imm. (im Druck)
22. SCHWARTZ, R.S., DAMESHEK, W.
The effects of 6-MP on homograft reactions
J. Clin. Invest. 39/952, 1960

23. SKOPINSKA, E., RYCHLIKOWA, M., NONZA, K.
Immunosuppressive drugs in lymphocyte mixed cultures
Bull. Acad. Pol. Sci. 16/6, 1968
24. SUSUMA KAWAGUCHI
Studies on the induction of immunological paralysis
to bovine gamma-globulin in adult mice. II. The effect
of cyclophosphamid
Imm. 19/2, 1970
25. SUTTON, W.R., GRIFFITH, H.B., PRESTON, F.W.
Effect of cancer chemotherapeutic agents on the survival
of homografts of skin
Surg. Forum 12/117, 1961
26. UYEKI, E.M., LONG, J.
Antitumor agents on the production of primary and
secondary spleen hemolysin plaque-forming cells
J. Pharmacol. Exp. Ther. 158/2, 1967

Herrn Prof. Dr. med. Friedrich Scheiffarth danke ich für die Überlassung des Themas und für die Übernahme des Referates.

Herrn Oberarzt Priv.-Doz. Dr. med. Hermut Warnatz und Herrn Dr. med. Hans-Wolfgang Baenkler danke ich sehr herzlich für die stets freundliche und verständnisvolle Unterweisung in allen praktischen und theoretischen Fragen.

LEBENS LAUF

Am 8.9.1944 wurde ich, Dietmar Fritz Leykam, als Sohn des Schreiners Konrad Leykam und seiner Ehefrau Lydia, geb. Höhn, in Ahorn-Coburg geboren.

Von 1950 - 1957 besuchte ich die Volksschule Ahorn-Coburg, bis 1960 die Staatliche Mittelschule in Coburg.

Anschließend begann ich bei der Bayer. Hypotheken- und Wechsel-Bank, Filiale Coburg, eine Banklehre, die ich im Februar 1963 erfolgreich abschloß.

Ein halbes Jahr später schied ich aus der Bank aus, um am Münchenkolleg (Städt. Institut zur Erlangung der Hochschulreife) im März 1966 das Abitur abzulegen.

Im Sommersemester 1966 begann ich das Medizinstudium an der Universität Erlangen-Nürnberg. Am 28. Januar 1972 beendete ich das Staatsexamen mit Erfolg.

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen Hauptstr. 109, (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990